

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: **Kazuhisa FUKUSHIMA**

Serial Number: **Not Yet Assigned**

Filed: **March 17, 2004**

Customer No.: 38834

For: **A METHOD AND APPARATUS FOR SEPARATING AND PURIFYING
BIOPOLYMERS**

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119

Commissioner for Patents
P. O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

March 17, 2004

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

Japanese Appln. No. 2003-103714, filed on April 8, 2003

Japanese Appln. No. 2003-103715, filed on April 8, 2003

In support of these claims, the requisite certified copies of said original foreign applications are filed herewith.

It is requested that the file of these applications be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copies.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 50-2866.

Respectfully submitted,
WESTERMAN, HATTORI, DANIELS & ADRIAN, LLP



Atty. Docket No.: 042187
1250 Connecticut Ave, N.W., Suite 700
Washington, D.C. 20036
Tel: (202) 822-1100
Fax: (202) 822-1111
NES/II

Nicolas E. Seckel
Reg. No. 44,373

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 8 日
Date of Application:

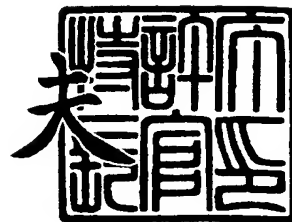
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 0 3 7 1 4
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 1 0 3 7 1 4]

出 願 人 横 河 電 機 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 9 月 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 7 3 4 2 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 02N0187

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 27/447

【発明者】

【住所又は居所】 東京都武蔵野市中町 2 丁目 9 番 3 2 号 横河電機株式会社
社内

【氏名】 福島 和久

【特許出願人】

【識別番号】 000006507

【氏名又は名称】 横河電機株式会社

【代表者】 内田 勲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005326

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 磁気ビーズに固定の生体高分子の抽出方法および抽出装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体試料から負の電荷を帯び磁気ビーズに固定されたターゲット生体高分子を抽出する方法であって、

前記生体試料を含む第 1 の溶液と、抽出された生体高分子を保存するための第 2 の溶液と、抽出された磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を保存するための第 3 の溶液をゲルによって互いに区切り、電気泳動により生体高分子を前記第 1 の溶液中から前記ゲルを経由して前記第 2 の溶液中へ移動させると共に、ゲル中を泳動中の磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を磁気吸引して前記第 3 の溶液中に移動させることによりターゲット生体高分子の抽出を行うことを特徴とする磁気ビーズに固定の生体高分子の抽出方法。

【請求項 2】

前記ゲルとして、微小円柱群または多孔質フィルターを使用したことを特徴とする請求項 1 記載の磁気ビーズに固定の生体高分子の抽出方法。

【請求項 3】

生体試料から負の電荷を帯び磁気ビーズに固定されたターゲット生体高分子を抽出する装置であって、

前記生体試料を含む第 1 の溶液と、抽出された生体高分子を保存するための第 2 の溶液と、抽出された磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を保存するための第 3 の溶液と、これら 3 つの溶液を互いに区切るゲルとを保持した容器と、

この容器内に、前記第 1 の溶液中からゲルおよび第 2 の溶液の方へ、負の電荷を帯びた生体高分子を電気泳動により移動させるために設けられた正負の電極と、

この正負の電極に正負の電圧をそれぞれ印加する電源と、

電気泳動により前記ゲル中を移動中の磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を磁気吸引して前記第 3 の溶液中へ移動させるための磁場を発生する磁界発生手段を備え、電気泳動および磁気吸引により磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を

第3の溶液中に移動し抽出することができるように構成したことを特徴とする磁気ビーズに固定の生体高分子の抽出装置。

【請求項4】

前記ゲルとして、微小円柱群または多孔質フィルターを使用したことを特徴とする請求項3記載の磁気ビーズに固定の生体高分子の抽出装置。

【請求項5】

前記磁界発生手段として、電磁石または電磁コイルまたは永久磁石を使用したことを特徴とする請求項3または4記載の磁気ビーズに固定の生体高分子の抽出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体試料の細胞から生体高分子を抽出分離する抽出装置や、その前処理装置、あるいは細胞からの生体高分子の抽出、増幅、検出などを一体的に行うカートリッジなどにおいて使用されるもので、生体試料である生体高分子の中からターゲット生体高分子を分離して抽出する方法および装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

以下、生体高分子としてDNAを例にとって説明する。DNAチップに用いるターゲットDNAを生体細胞から抽出し回収する方法としては、大別して2種類の方法がある。1つは遠心分離による方法であり、他方は磁気ビーズによる方法である。

遠心分離による方法はそのための装置が大がかりであるため、小型化が望まれる将来の方向としては磁気ビーズによる方法が主流になると予測される（磁気ビーズの応用例としては例えば非特許文献1参照）。

【0003】

磁気ビーズによる方法とは例えば次のような方法である。磁気ビーズの表面に、ある密度でプローブDNAあるいはプローブ抗体を固定し、溶液中のターゲットDNAとプローブとの相補結合により溶液中のDNAの回収を行い、その後磁石により

磁気ビーズを集め、洗浄した後磁気ビーズ表面からDNAを溶液により解離し回収する方法である。

【0004】

さて、このような磁気ビーズ方式を採用した装置として現在は卓上型パーソナルコンピュータ程度の大きさのものが実現されているが、その装置がチップ化され小型化されたものは未だ出現していない。

ただし、小型チップ化するために、 μ TAS (micro/miniaturized total analysis system) を活用したデバイスは、現在色々な分野で紹介されている (μ TASについては例えば非特許文献2参照)。

【0005】

【非特許文献1】

松永是監修、「DNAチップ応用技術」、株式会社シーエムシー、2000年7月発行、第7章 磁気ビーズ利用DNAチップ 竹山春子, 中山秀喜

【非特許文献2】

庄子 習一、「生化学 マイクロ化学分析システム—マイクロマシン技術—」、第1頁、第1および第2項、図1、[2003/02/26検索]、インターネット<URL: <http://www.jaclap.org/LabCP/pl1.html>>

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、この μ TASデバイスにおいて、駆動装置であるポンプや、制御装置であるバルブ、そして攪拌装置であるミキサーなどは実用に耐えるものなかなか実現されておらず、そのため流体の移動を伴う μ TASデバイスでは商品化されたものは多くない。

【0007】

これは、ミクロの世界では流体の粘性や流路形状等により流体動特性が大きく変わり、経済的および機能的に課題を解決できる要素技術が未だ試行錯誤の段階にあるためと考えられる。

それゆえ、流体の移動を伴うことなく、磁気ビーズに固定のターゲット生体高分子を他の生体高分子から分離し抽出することのできる方式の出現が望まれている。

る。

【0008】

本発明の目的は、上記の課題を解決するもので、流体の移動を伴うことなく、磁気ビーズに固定のターゲット生体高分子を他の生体高分子から分離し抽出（以下単に抽出という）することができ、かつ小型化も図り得る磁気ビーズに固定の生体高分子の抽出方法および装置を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

このような目的を達成するために、請求項1の方法の発明では、
生体試料から負の電荷を帯び磁気ビーズに固定されたターゲット生体高分子を抽出する方法であって、

前記生体試料を含む第1の溶液と、抽出された生体高分子を保存するための第2の溶液と、抽出された磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を保存するための第3の溶液をゲルによって互いに区切り、電気泳動により生体高分子を前記第1の溶液中から前記ゲルを経由して前記第2の溶液中へ移動させると共に、ゲル中を泳動中の磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を磁気吸引して前記第3の溶液中に移動させることにより磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子の抽出を行うことを特徴とする。

【0010】

電気泳動と磁気吸引の組合わせにより、磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を容易に抽出することができる。従来のような溶液の移動は一切伴わず、ポンプやバルブ、ミキサーなどを必要としない。

【0011】

この場合、請求項2のように、ゲルとして微小円柱群または多孔質フィルターなどを使用することができる。

【0012】

請求項3の装置の発明は、生体試料から負の電荷を帯び磁気ビーズに固定されたターゲット生体高分子を抽出する装置であって、

前記生体試料を含む第1の溶液と、抽出された生体高分子を保存するための第

2の溶液と、抽出された磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を保存するための第3の溶液と、これら3つの溶液を互いに区切るゲルとを保持した容器と、

この容器内に、前記第1の溶液中からゲルおよび第2の溶液の方へ、負の電荷を帯びた生体高分子を電気泳動により移動させるために設けられた正負の電極と、

この正負の電極に正負の電圧をそれぞれ印加する電源と、

電気泳動により前記ゲル中を移動中の磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を磁気吸引して前記第3の溶液中へ移動させるための磁場を発生する磁界発生手段を備え、電気泳動および磁気吸引により磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を第3の溶液中に移動し抽出することができるように構成したことを特徴とする。

【0013】

このような構成によれば、電気泳動と磁気吸引の組合わせにより、磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を容易に抽出することができる。そして、従来のような溶液の移動は一切伴わず、ポンプやバルブ、ミキサーなどを必要としないため、装置の小型化も可能である。

【0014】

この場合、請求項4のように、ゲルとして微小円柱群または多孔質フィルターなどを使用することができる。

また、請求項5のように、磁界発生手段としては、電磁石または電磁コイルまたは永久磁石を使用することができる。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下図面を用いて本発明を詳しく説明する。図1は本発明に係る磁気ビーズに固定の生体高分子の抽出方法を実施するための装置の一実施例を示す要部構成図である。本発明では、生体試料である生体高分子〔例えばDNAやRNA（RNAはDNAからの転写産物、すなわちmRNAまたはrRNAまたはtRNAまたは低分子RNAである）、タンパク質などである〕の中から、負の電荷を帯びた既知のターゲット生体高分子を抽出するものである。通常の電気泳動装置により未知の生体高分子を電気泳動により画定・同定するものとは相違する。

【0016】

なお、本実施例では、生体高分子としてDNA（より詳しくはDNA断片）を例にとって説明する。図において、1はガラス板などで平型箱状に形成され、DNAの電気泳動を行うための密閉状の容器である。この容器1内には、中央部にゲル4が配置されると共に、そのゲル4の三方に接して、生体試料を含む溶液（溶液Aあるいは第1の溶液ともいう）2と、移動された生体高分子を保存するための溶液（溶液Bあるいは第2の溶液ともいう）3と、抽出されたターゲットDNA 5を保存するための溶液（溶液Cあるいは第3の溶液ともいう）10がそれぞれ充填されている。

【0017】

なお、ターゲットDNA 5は負の電荷を帯び、磁気ビーズ5a表面には複数個のターゲットDNA 5が固定されている。なお、ここでは、磁気ビーズに固定されたターゲットDNAを磁気ビーズ固定ターゲットDNAともいう。

【0018】

また、溶液Aと溶液B中にはそれぞれ負の電極（－電極という）6と正の電極（＋電極という）7が配置されており、この2つの電極には電源8から負と正の電圧がそれぞれ印加される。

また、容器1の溶液C部の外側には磁気ビーズを磁気吸引するための磁場を発生する磁界発生手段11が配置されている。

【0019】

このような構成における動作を次に説明する。溶液A中に生体試料を注入しておく。生体試料には、磁気ビーズ固定ターゲットDNA 5と、それ以外の生体高分子が混在している。この生体試料中からターゲットDNA 5を以下のようにして抽出する。

【0020】

まず、＋電極7と－電極6に電源8からの正負の電圧をそれぞれ印加して電気泳動を行う。負の電荷を帯びているターゲットDNA 5および他の生体高分子は＋電極7側に引き寄せられ、移動する。

一方、同時に磁界発生手段11により溶液Cの方向に磁界をかけると、ゲル4

中を泳動中の磁気ビーズ結合ターゲット DNA 5 は溶液 C 中へ引き寄せられ、分離抽出される。電気泳動中の他の生体高分子は磁気を帯びていないので、磁界に影響されず、溶液 B 中へ移動する。

【0021】

なお、本発明は、上記実施例に限定されることなく、その本質から逸脱しない範囲で更に多くの変更、変形をも含むものである。

例えば、ゲルとしては、微小な柱（ピラー）のアレイあるいは多孔質で形成されたフィルターを使用してもよい。

【0022】

また、実施例では DNA を例にとって説明したが、本発明は DNA に限らず、負の電荷を帯び磁気ビーズに結合された生体高分子を対象に抽出することができる。

また、磁界発生手段として、電磁石または電磁コイルまたは永久磁石を用いることもできる。

【0023】

【発明の効果】

以上説明したように本発明によれば、 μ TAS 活用のデバイスで必要としたポンプやバルブ、ミキサーなどを用いることなく、また溶液などの移動を伴うことなく、電気泳動と磁気吸引とによって生体試料から磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を容易に分離し抽出することができる。

【0024】

なお、 μ TAS 技術を応用したデバイスは今後色々と実用化されて来る。そのとき、成分の分離や抽出が目的であり、しかも対象が電荷を帯びているような場合には、電気泳動により抽出を行うことが可能であり、機構が複雑となるポンプやバルブを使わなくてもその目的を達成することができる箇所には本発明を適用することができ、その効果は大である。

【0025】

また、細胞から分子あるいは生体高分子を抽出する抽出装置や前処理装置、あるいは抽出機能および DNA 増幅機能そして検出反応を一体型で行うようにした

カートリッジなどにおいては、分子あるいは生体高分子の中から磁気ビーズに固定のターゲット分子を分離・抽出する部分に本発明を適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係る磁気ビーズに固定の生体高分子の抽出方法を実施するための装置の一実施例を示す要部構成図である。

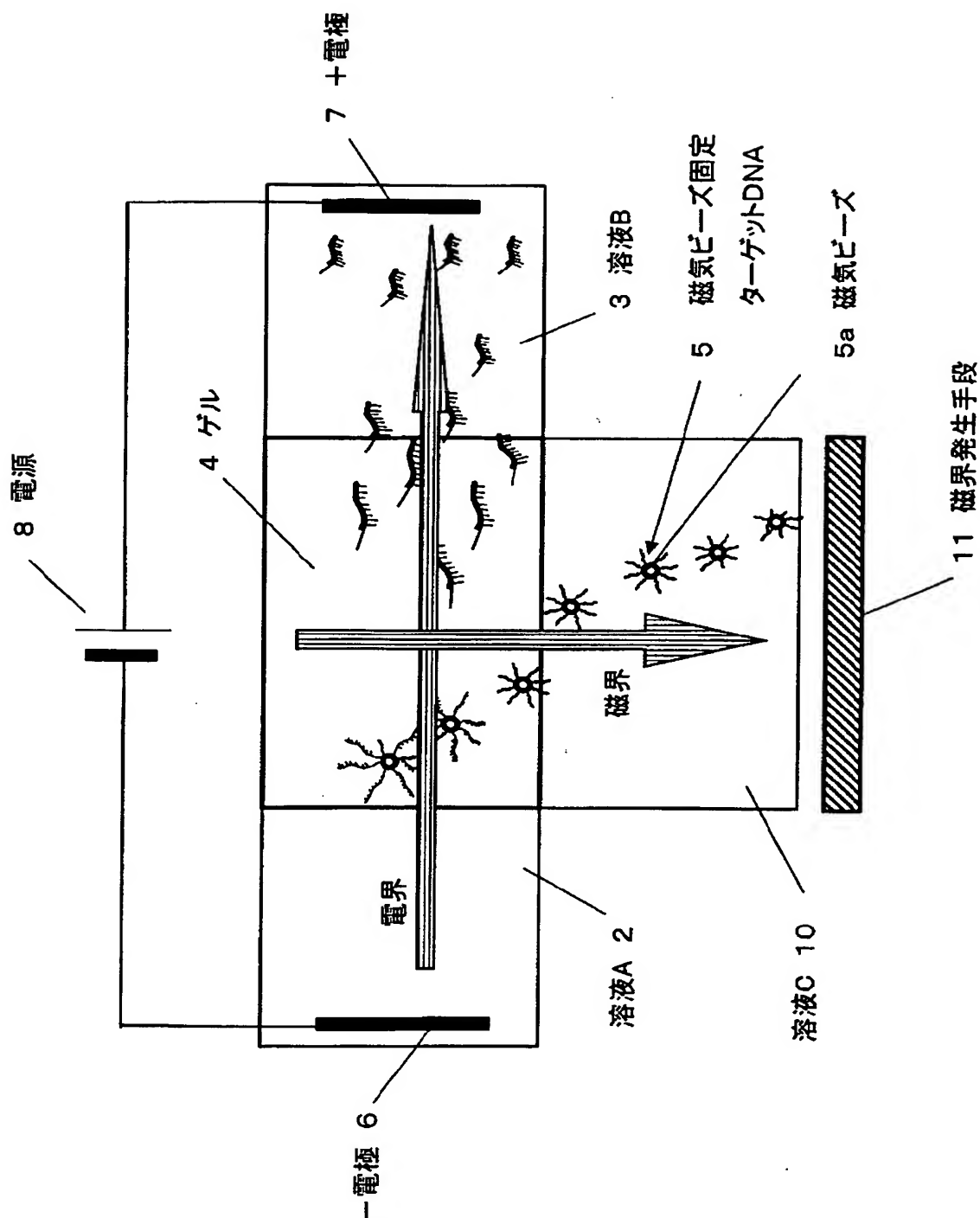
【符号の説明】

- 1 容器
- 2 溶液 A
- 3 溶液 B
- 4 ゲル
- 5 磁気ビーズ固定ターゲット DNA
- 6、7 電極
- 8 電源
- 10 溶液 C
- 11 磁界発生手段

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 流体の移動を伴うことなく、磁気ビーズに固定のターゲット生体高分子を他の生体高分子から分離し抽出することができ、かつ小型化も図り得る、磁気ビーズに固定の生体高分子の抽出方法および装置を提供する。

【解決手段】 生体試料から負の電荷を帯び磁気ビーズに固定されたターゲット生体高分子を抽出する方法であって、前記生体試料を含む第 1 の溶液と、抽出された生体高分子を保存するための第 2 の溶液と、抽出された磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を保存するための第 3 の溶液をゲルによって互いに区切り、電気泳動により生体高分子を前記第 1 の溶液中から前記ゲルを経由して前記第 2 の溶液中へ移動させると共に、ゲル中を泳動中の磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子を磁気吸引して前記第 3 の溶液中に移動させることにより磁気ビーズ固定ターゲット生体高分子の抽出を行う。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

| | |
|---------|----------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2003-103714 |
| 受付番号 | 50300579502 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第一担当上席 0090 |
| 作成日 | 平成15年 4月 9日 |

<認定情報・付加情報>

| | |
|-------|-------------|
| 【提出日】 | 平成15年 4月 8日 |
|-------|-------------|

次頁無

特願 2 0 0 3 - 1 0 3 7 1 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 6 5 0 7]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都武蔵野市中町 2 丁目 9 番 3 2 号

氏 名

横河電機株式会社